

TRAITE D'COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

31

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 09 avril 1999 (09.04.99)	
Demande internationale no PCT/FR98/01767	Référence du dossier du déposant ou du mandataire RS Cas 252 - AB/CB
Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 août 1998 (07.08.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 26 août 1997 (26.08.97)
Déposant MARTINEZ, Jean etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

16 février 1999 (16.02.99)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Sean Taylor no de téléphone: (41-22) 338.83.38
---	---

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire RS Cas 252 - AB/CB	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 98/ 01767	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07/08/1998	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 26/08/1997
Déposant SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

2. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

3. ☒ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence

☐ déposé avec la demande internationale

☒ fourni par le déposant séparément de la demande internationale

☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.

☐ transcrit par l'administration

4. En ce qui concerne le titre, ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:

Figure n° - ☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

FR 98/01767

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C07H21/00 C12N15/11 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07H C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>A.G.KATOPODIS ET AL.: "Functional and Structural Characterization of Peptidylamidoglycolate Lyase, the Enzyme Catalyzing the Second Step in Peptide Amidation." BIOCHEMISTRY., vol. 30, no. 25, 25 juin 1991, pages 6189-6194, XP002074069 EASTON, PA US cité dans la demande voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 janvier 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/01/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scott, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 98/01767

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>S.A. NARANG: "dna synthesis" TETRAHEDRON., vol. 39, no. 1, 1983, pages 3-22, XP002074070 OXFORD GB cité dans la demande voir le document en entier -----</p>	1

A: CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07H21/00 C12N15/11 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07H C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>A.G.KATOPODIS ET AL.: "Functional and Structural Characterization of Peptidylamidoglycolate Lyase, the Enzyme Catalyzing the Second Step in Peptide Amidation." BIOCHEMISTRY., vol. 30, no. 25, 25 juin 1991, pages 6189-6194, XP002074069 EASTON, PA US cité dans la demande voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 janvier 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/01/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scott, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No
PCT/FR 98/01767

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>S.A.NARANG: "dna synthesis" TETRAHEDRON., vol. 39, no. 1, 1983, pages 3-22, XP002074070 OXFORD GB cité dans la demande voir le document en entier -----</p>	1

TRAITE D'COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Van ER

PCT

INFORMATIONS RELATIVES AUX
OFFICES ELUS QUI ONT RECU
NOTIFICATION DE LEUR ELECTION

(règle 61.3 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

BOURGOUIN, André
Beaufour IPSEN - S.C.A.F.
Direction de la Propriété
Industrielle
42, rue du Docteur Blanche
F-75016 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)

09 avril 1999 (09.04.99)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

RS Cas 252 - AB/CB

INFORMATION IMPORTANTE

Demande internationale no

PCT/FR98/01767

Date du dépôt international (jour/mois/année)

07 août 1998 (07.08.98)

Date de priorité (jour/mois/année)

26 août 1997 (26.08.97)

Déposant

SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES
(S.C.R.A.S.) etc

1. Le déposant est informé que le Bureau international a, conformément à l'article 31.7), notifié à chacun des offices suivants son élection:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, GB, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US, VN

2. Les offices suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle ils sont notifiés de leur élection; la notification de leur élection leur sera envoyée par le Bureau international seulement à leur demande:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BY, CH, CU, DK, EE, ES, FI, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, YU, ZW

3. Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices mentionnés ci-dessus avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité. Pour ce faire, il doit payer la ou les taxes nationales et remettre, si elle est prescrite, une traduction de la demande internationale (article 39.1a) ainsi que, le cas échéant, une traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3b) et règle 74.1).

Certains offices ont fixé des délais supérieurs au délai mentionné ci-dessus. Pour des renseignements détaillés au sujet des délais applicables et des actes à accomplir à l'ouverture de la phase nationale auprès d'un office donné, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

L'ouverture de la phase régionale européenne est différée jusqu'à l'expiration d'un délai de 31 mois à compter de la date de priorité pour la totalité des Etats désignés aux fins de l'obtention d'un brevet européen.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Sean Taylor

no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 02 NOV 1999

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL PCT

(article 36 et règle 70 du PCT)


Référence du dossier du déposant ou du mandataire RS Cas 252 - AB/DD	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/01767	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07/08/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 26/08/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07H21/00		
Déposant SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 4 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent six feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 16/02/1999	Date d'achèvement du présent rapport
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Gohlke, P N° de téléphone +49 89 2399 8549



**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/01767

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1,3-14	version initiale	
2	reçue(s) avec télécopie du	30/09/1999

Revendications, N°:

1-15	version initiale	
16-25	reçue(s) avec télécopie du	30/09/1999

Dessins, feuilles:

1/3-3/3	reçue(s) avec télécopie du	30/09/1999
---------	----------------------------	------------

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/01767

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-25
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-25
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-25
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Section V:

Aucun art antérieur **disponible** ne divulgue l'objet revendiqué dans la présente demande concernant de nouveaux oligonucléotides et leur application comme sondes pour l'identification des ARNm codant pour les précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées.

Le document "Biochemistry, 1991, 30, 6189-6194" considéré comme représentant l'art antérieur le plus proche, décrit le mécanisme d'action et la structure de l'enzyme peptidylaminoglycolate lyase qui catalyse la réaction d'amidation des précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées (extrémité C-terminale avec fonction acide libre) en l'hormone active et résistante (extrémité C-terminale amidée), et permet ainsi la maturation de l'hormone. Il est connu de ce document que

La présente demande concerne l'identification de précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées, (et ainsi l'identification de nouvelles hormones polypeptidiques amidées) par application des oligonucléotides OX, ou OX et OZ, comme sondes pour l'identification des ARNm codant pour lesdits précurseurs d'hormones. Les oligonucléotides OX étant capables de s'hybrider avec OY = séquence oligonucléotidique codant pour le site de reconnaissance sur le précurseur de ou des hormones de séquence Gly Arg(Lys) Arg(Lys), et les oligonucléotides OZ étant capables de s'hybrider avec une séquence consensus signal caractéristique des hormones polypeptidiques amidées comportant la séquence Leu Leu aa1 aa2 Leu. Cette méthode se différencie donc des techniques classiques d'isolement et de purification des protéines et offre l'avantage de mettre en évidence simultanément plusieurs hormones par identification directe de la séquence nucléotidique codant pour lesdits précurseurs.

L'objet des revendications de la présente demande semble donc satisfaire aux conditions des articles 33(2) et (3) du PCT.

Cette réaction impose la présence d'un site de reconnaissance sur le précurseur de ou des hormones, site qui comporte toujours la séquence : glycine et deux acides aminés basiques (arginine ou lysine) (cf. A.G. Katopodis et coll., *Biochemistry*, **30**(25), 6189-6194, June 1991, et références citées).

- 5 Les hormones polypeptidiques amidées qui sont destinées à être sécrétées hors du réticulum endoplasmique sont connues pour comporter une séquence consensus signal d'une quinzaine à une trentaine d'acides aminés, cette séquence est présente à l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique. Elle est coupée plus tard par une enzyme signal peptidase, de sorte qu'on ne la retrouve plus dans la protéine une fois sécrétée
10 (cf. F. Cuttitta, *The Anatomical Record*, **236**, 87-93 (1993) et références citées).

A l'heure actuelle, la découverte d'une nouvelle protéine n'est pas une chose aisée. L'isolement et la purification des protéines peuvent se faire par des techniques diverses : précipitation au point isoélectrique, extraction sélective par certains solvants, puis purification par cristallisation, distribution à contre courant, chromatographie
15 d'adsorption, de partage ou par échange d'ions, électrophorèse... Cependant ces techniques sous-entendent la connaissance des propriétés de la protéine à isoler. Par ailleurs, lorsqu'on dispose d'un échantillon pur d'une nouvelle protéine intéressante sur le plan thérapeutique, il reste encore de nombreuses étapes avant de disposer d'un micro-organisme génétiquement modifié capable de la synthétiser.

- 20 La méthode proposée par la présente invention offre l'avantage, par l'utilisation d'une particularité de la séquence peptidique du précurseur de toutes hormones amidées connues à ce jour, de permettre la mise en évidence simultanée de plusieurs nouvelles hormones de cette catégorie. Cette recherche se fait par l'identification directe de la séquence nucléotidique codant pour lesdits précurseurs dans des banques d'ADNc
25 préparées à partir de tissus dans lesquels les précurseurs de ces hormones sont susceptibles d'être synthétisés.

La recherche par cette méthode est beaucoup moins contraignante que les techniques classiques de biochimie citées précédemment car :

- elle peut conduire à isoler, suivant le même principe, plusieurs précurseurs distincts
30 présents dans le même tissu ;
- elle permet de mettre en évidence, dans les mêmes conditions techniques, des précurseurs correspondant à des hormones ayant des propriétés biochimiques et biologiques très différentes ;
- elle autorise l'identification concomitante de toutes les hormones peptidiques pouvant
35 être contenues dans le même précurseur.

16. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- hybridation d'un ou plusieurs oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 avec ladite banque d'ADN;
- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;
- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs précurseurs de peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

10 17. Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'étape d'hybridation utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

18. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et d'un autre ensemble d'oligonucléotides selon la revendication 14;
- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;
- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs précurseurs de peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

19. Méthode selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

25 20. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;

- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;

- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs précurseurs de peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

5 21. Méthode selon la revendication 20, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

22. Méthode d'identification du précurseur d'un polypeptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;

10 - utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendication 1 à 7 et un autre oligonucléotide simple brin capable de s'hybrider en conditions douces ou stringentes avec une séquence consensus universelle contenue dans la séquence du vecteur plasmidique dans lequel sont clonés les ADNc de la dite banque d'ADN, tels que les
15 primers T3, T7, KS, SK, M13, Reverse;

- identification de la séquence d'ADNc de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendication 1 à 7;

- identification dans cette séquence d'un ou plusieurs précurseurs de peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

20 23. Méthode selon la revendication 22, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

24. Méthode selon l'une quelconque des revendications 16 à 23, caractérisée en ce que la banque d'ADN est une banque d'ADNc.

25 25. Méthode selon l'une quelconque des revendications 16 à 24, caractérisée en ce que l'oligonucléotide simple brin est détectable à l'aide d'un agent de marquage, tel que le ³²P ou la digoxygénine.

Séquence du plasmide pGEM®-T Easy Vector

Le plasmide pGEM®-T Easy Vector, dont la séquence est reproduite ci-dessous, a été linéarisé avec *EcoR* V à la base 60 de cette séquence (indiquée par une astérisque). On lui a ajouté un T aux deux extrémités 3'. Le T ajouté n'est pas inclus dans cette séquence. La séquence reproduite ci-après correspond à l'ARN synthétisé par la T7 ARN polymérase et est le complémentaire de l'ARN synthétisé par la SP6 ARN polymérase.

1	GGCGGAATTG	GGCCCCGACGT	CGCATGCTCC	CGGCCGCCAT	GGCGGCCGCG
51	GGAAATTCGAT	ATCACTAGTG	AATTCGCGGC	CGCCTGCAGG	TCGACCATAT
101	GGGAGAGCTC	CCAACGCGTT	GGATGCATAG	CTTGAGTATT	CTATAGTGTC
151	ACCTAAATAG	CTTGCGCTAA	TCATGGTCAT	AGCTGTTTCC	TGTGTGAAAT
201	TGTTATCCGC	TCACAATTCC	ACACAACATA	CGAGCCGGAA	GCATAAAGTG
251	TAAAGCCTGG	GGTGCCTAAT	GAGTGAGCTA	ACTCACATTA	ATTGCGTTGC
301	GCTCACTGCC	CGCTTTCCAG	TCCGGAAACC	TGTCGTGCCA	GCTGCATTAA
351	TGAATCGGCC	AACGCGCGGG	GAGAGGCGGT	TTGCGTATTC	GGCGCTCTTC
401	CGCTTCCTCG	CTCACTGACT	CGCTGCGCTC	GGTCGTTCCG	CTGCGGCGAG
451	CGGTATCAGC	TCACTCAAAG	CGCGTAATAC	GGTTATCCAC	AGAATCAGGG
501	GATAACGCAG	GAAAGAACAT	GTGAGCAAAA	GGCCAGCAAA	AGGCCAGGAA
551	CCGTAAAAAG	GCCGCGTTGC	TGGCGTTTTT	CCATAGGCTC	CGCCCCCCTG
601	ACGAGCATCA	CAAAAATCGA	CGCTCAAGTC	AGAGGTGGCG	AAACCCGACA

Dessin 1/3

AMENDED SHEET

651	GGACTATAAA	GATACCAGGC	GTTTCCCCCT	GGAAGCTCCC	TCGTGCGCTC
701	TCCTGTTCCG	ACCCTGCCGC	TTACCGGATA	CCTGTCCGCC	TTTCTCCCTT
751	CGGGAAGCGT	GGCGCTTTCT	CATAGCTCAC	GCTGTAGGTA	TCTCAGTTCC
801	GTGTAGGTCG	TTCGCTCCAA	GCTGGGCTGT	GTGCACGAAC	CCCCCGTTCA
851	GCCCGACCGC	TGCGCCTTAT	CCGGTAACTA	TCGTCTTGAG	TCCAACCCGG
901	TAAGACACGA	CTTATCGCCA	CTGGCAGCAG	CCACTCGTAA	CAGGATTACC
951	AGAGCGAGGT	ATGTAGGCGG	TGCTACAGAG	TTCTTGAAGT	GGTGGCCTAA
1001	CTACCGCTAC	ACTAGAAGGA	CAGTATTTGG	TATCTGCCCT	CTGCTGAAGC
1051	CAGTTACCTT	CGGAAAAGA	GTTGGTAGCT	CTTGATCCCG	CAAACAAACC
1101	ACCGCTGGTA	GCGGTGGTTT	TTTTGTTTGC	AAGCAGCAGA	TTACGCGCAG
1151	AAAAAAAGGA	TCTCAAGAAG	ATCCTTTGAT	CTTTTCTACG	GGGTCTGACG
1201	CTCAGTGGAA	CGAAACTCA	CGTTAAGGGA	TTTTGGTCAT	GAGATTATCA
1251	AAAAGGATCT	TCACCTAGAT	CCTTTTAAAT	TAAAAATGAA	GTTTTAAATC
1301	AATCTAAAGT	ATATATGAGT	AAACTTGGTC	TGACAGTTAC	CAATGCTTAA
1351	TCAGTGAGGC	ACCTATCTCA	GCGATCTGTC	TATTTGTTTC	ATCCATAGTT
1401	GCCTGACTCC	CCGTCTGTGA	GATAACTACG	ATACGGGAGG	GCTTACCATC
1451	TGGCCCCAGT	GCTGCAATGA	TACCGCGAGA	CCCACGCTCA	CCGGCTCCAG
1501	ATTTATCAGC	AATAAACCAG	CCAGCCGGAA	GGGCCGAGCG	CAGAAGTGGT
1551	CCTGCAACTT	TATCCGCCTC	CATCCAGTCT	ATTAATTGTT	GCCGGGAAGC
1601	TAGAGTAAGT	AGTTCGCCAG	TTAATAGTTT	GCGCAACGTT	GTTGGCATTG
1651	CTACAGGCAT	CGTGGTGTCA	CGCTCGTCGT	TGCGTATGGC	TTCATTACGC
1701	TCCCGTTCCC	AACGATCAAG	GCGAGTTACA	TGATCCCCCA	TGTTGTGCAA
1751	AAAAGCGGTT	AGCTCCTTCG	GTCCTCCGAT	CGTTGTCAGA	AGTAAGTTGG

Dessin 2/3

AMENDED SHEET

1801 CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT
1851 GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA
1901 GTCATTCTGA GAATAGTGTA TCGGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT
1951 CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC
2001 ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAAC TC AAGGATCT TACCGCTGTT
2051 GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT
2101 CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT
2151 GCGGCAAAA AGGGAATAAG GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT
2201 CTTCTTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA
2251 CCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG
2301 CGCACATTTC CCCGAAAAGT GCCACCTGTA TGCGGTGTGA AATACCGCAC

2351 AGATCCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGAAATTGTA AACGTTAATA
2401 TTTTGTTAAA ATTCCGCTTA AATATTTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC
2451 CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAG AATAGACCGA
2501 GATAGGGTTG AGTGTTGTTT CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA
2551 ACGTGGACTC CAACGTCAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC
2601 CCACTACGTG AACCATCACC CAAATCAAGT TTTTGCGGT CGAGGTGCCG
2651 TAAAGCTCTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC
2701 GGGGAAAGCC GCGGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA
2751 GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC
2801 CACACCCGCC GCGCTTAATG CCGCGCTACA GGGCGCGTCC ATTGCCCATT
2851 CAGGCTGCCG AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT
2901 TACGCCAGCT GCGGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA
2951 ACGCCAGGGT TTTCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT
3001 GTAATACGAC TCACTATA

Dessin 3/3

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

5640

09/486142

Applicant's or agent's file reference RS Cas 252 - AB/DD	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/01767	International filing date (day/month/year) 07 August 1998 (07.08.1998)	Priority date (day/month/year) 26 August 1997 (26.08.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07H 21/00		
Applicant SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.)		

5000

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.



This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 February 1999 (16.02.1999)	Date of completion of this report
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/01767

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1, 3-14, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages 2, filed with the letter of 30 September 1999 (30.09.1999),
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-15, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 16-25, filed with the letter of 30 September 1999 (30.09.1999),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig 1/3-3/3, filed with the letter of 30 September 1999 (30.09.1999),
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

None of the **available** prior art documents discloses the subject matter claimed in the present application relating to novel oligonucleotides and their application as probes for identifying mRNAs coding for the precursors of amidated polypeptide hormones.

The document "Biochemistry, 1991, 30, 6189-6194", considered to represent the closest prior art, describes the action mechanism and structure of the enzyme peptidylaminoglycolate lyase, which catalyses the amidation reaction of the amidated polypeptide hormone precursors (C-terminal end point with free acid function) into the active and resistant hormone (amidated C-terminal end point), and thus enables the hormone to mature. It is known from the document in question that:

The present application relates to the identification of amidated polypeptide hormone precursors (and thus the identification of novel amidated polypeptide hormones) through the application of the oligonucleotides OX, or OX and OZ, as probes for identifying mRNAs coding for said hormone precursors. The OX oligonucleotides are able to form hybrids with OY = oligonucleotide sequence coding for the recognition site on the precursor of the hormone(s) of sequence Gly Arg(Lys) Arg(Lys), and the OZ oligonucleotides are able to form hybrids with a signal



consensus sequence characteristic of the amidated polypeptide hormones comprising the sequence Leu Leu aa1 aa2 Leu. This method therefore differs from the conventional techniques used for isolating and purifying proteins, and offers the advantage of providing simultaneously several hormones by direct identification of the nucleotide sequence coding for said precursors. The subject matter of the claims of the present application therefore appears to satisfy the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire RS Cas 252 - AB/DD		POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/01767		Date du dépôt international (jour/mois/année) 07/08/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 26/08/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07H21/00			
Déposant SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET et al.			
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 4 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent six feuilles.</p>			
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 			
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 16/02/1999		Date d'achèvement du présent rapport 20 08 99	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Fonctionnaire autorisé Gohlke, P N° de téléphone +49 89 2399 8549 	

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/01767

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1,3-14	version initiale	
2	reçue(s) avec télécopie du	30/09/1999

Revendications, N°:

1-15	version initiale	
16-25	reçue(s) avec télécopie du	30/09/1999

Dessins, feuilles:

1/3-3/3	reçue(s) avec télécopie du	30/09/1999
---------	----------------------------	------------

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/01767

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-25
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-25
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-25
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Section V:

Aucun art antérieur **disponible** ne divulgue l'objet revendiqué dans la présente demande concernant de nouveaux oligonucléotides et leur application comme sondes pour l'identification des ARNm codant pour les précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées.

Le document "Biochemistry, 1991, 30, 6189-6194" considéré comme représentant l'art antérieur le plus proche, décrit le mécanisme d'action et la structure de l'enzyme peptidylaminoglycolate lyase qui catalyse la réaction d'amidation des précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées (extrémité C-terminale avec fonction acide libre) en l'hormone active et résistante (extrémité C-terminale amidée), et permet ainsi la maturation de l'hormone. Il est connu de ce document que

La présente demande concerne l'identification de précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées, (et ainsi l'identification de nouvelles hormones polypeptidiques amidées) par application des oligonucléotides OX, ou OX et OZ, comme sondes pour l'identification des ARNm codant pour lesdits précurseurs d'hormones. Les oligonucléotides OX étant capables de s'hybrider avec OY = séquence oligonucléotidique codant pour le site de reconnaissance sur le précurseur de ou des hormones de séquence Gly Arg(Lys) Arg(Lys), et les oligonucléotides OZ étant capables de s'hybrider avec une séquence consensus signal caractéristique des hormones polypeptidiques amidées comportant la séquence Leu Leu aa1 aa2 Leu. Cette méthode se différencie donc des techniques classiques d'isolement et de purification des protéines et offre l'avantage de mettre en évidence simultanément plusieurs hormones par identification directe de la séquence nucléotidique codant pour lesdits précurseurs.

L'objet des revendications de la présente demande semble donc satisfaire aux conditions des articles 33(2) et (3) du PCT.

Cette réaction impose la présence d'un site de reconnaissance sur le précurseur de ou des hormones, site qui comporte toujours la séquence : glycine et deux acides aminés basiques (arginine ou lysine) (cf. A.G. Katopodis et coll., *Biochemistry*, **30**(25), 6189-6194, June 1991, et références citées).

5 Les hormones polypeptidiques amidées qui sont destinées à être sécrétées hors du réticulum endoplasmique sont connues pour comporter une séquence consensus signal d'une quinzaine à une trentaine d'acides aminés, cette séquence est présente à l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique. Elle est coupée plus tard par une enzyme signal peptidase, de sorte qu'on ne la retrouve plus dans la protéine une fois sécrétée
10 (cf. F. Cuttitta, *The Anatomical Record*, **236**, 87-93 (1993) et références citées).

A l'heure actuelle, la découverte d'une nouvelle protéine n'est pas une chose aisée. L'isolement et la purification des protéines peuvent se faire par des techniques diverses : précipitation au point isoélectrique, extraction sélective par certains solvants, puis purification par cristallisation, distribution à contre courant, chromatographie
15 d'adsorption, de partage ou par échange d'ions, électrophorèse... Cependant ces techniques sous-entendent la connaissance des propriétés de la protéine à isoler. Par ailleurs, lorsqu'on dispose d'un échantillon pur d'une nouvelle protéine intéressante sur le plan thérapeutique, il reste encore de nombreuses étapes avant de disposer d'un micro-organisme génétiquement modifié capable de la synthétiser.

20 La méthode proposée par la présente invention offre l'avantage, par l'utilisation d'une particularité de la séquence peptidique du précurseur de toutes hormones amidées connues à ce jour, de permettre la mise en évidence simultanée de plusieurs nouvelles hormones de cette catégorie. Cette recherche se fait par l'identification directe de la séquence nucléotidique codant pour lesdits précurseurs dans des banques d'ADNc
25 préparées à partir de tissus dans lesquels les précurseurs de ces hormones sont susceptibles d'être synthétisés.

La recherche par cette méthode est beaucoup moins contraignante que les techniques classiques de biochimie citées précédemment car :

- elle peut conduire à isoler, suivant le même principe, plusieurs précurseurs distincts
30 présents dans le même tissu ;
- elle permet de mettre en évidence, dans les mêmes conditions techniques, des précurseurs correspondant à des hormones ayant des propriétés biochimiques et biologiques très différentes ;
- elle autorise l'identification concomitante de toutes les hormones peptidiques pouvant
35 être contenues dans le même précurseur.

RECEVU 8-1-92

16. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- hybridation d'un ou plusieurs oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 avec ladite banque d'ADN;
- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;
- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs précurseurs de peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

10 17. Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'étape d'hybridation utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

18. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et d'un autre ensemble d'oligonucléotides selon la revendication 14;
- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;
- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs précurseurs de peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

19. Méthode selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

20. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;

- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;

- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs précurseurs de peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

5 21. Méthode selon la revendication 20, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

22. Méthode d'identification du précurseur d'un polypeptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;

10 - utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendication 1 à 7 et un autre oligonucléotide simple brin capable de s'hybrider en conditions douces ou stringentes avec une séquence consensus universelle contenue dans la séquence du vecteur plasmidique dans lequel sont clonés les ADNc de la dite banque d'ADN, tels que les
15 primers T3, T7, KS, SK, M13, Reverse;

- identification de la séquence d'ADNc de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendication 1 à 7;

- identification dans cette séquence d'un ou plusieurs précurseurs de peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

20 23. Méthode selon la revendication 22, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

24. Méthode selon l'une quelconque des revendications 16 à 23, caractérisée en ce que la banque d'ADN est une banque d'ADNc.

25 25. Méthode selon l'une quelconque des revendications 16 à 24, caractérisée en ce que l'oligonucléotide simple brin est détectable à l'aide d'un agent de marquage, tel que le ³²P ou la digoxygénine.

Séquence du plasmide pGEM®-T Easy Vector

Le plasmide pGEM®-T Easy Vector, dont la séquence est reproduite ci-dessous, a été linéarisé avec *EcoR* V à la base 60 de cette séquence (indiquée par une astérisque). On lui a ajouté un T aux deux extrémités 3'. Le T ajouté n'est pas inclus dans cette séquence. La séquence reproduite ci-après correspond à l'ARN synthétisé par la T7 ARN polymérase et est le complémentaire de l'ARN synthétisé par la SP6 ARN polymérase.

1	GGGCGAATTG	GGCCCGACGT	CGCATGCTCC	CGGCCGCCAT	GGCGGCCGCG
51	GGAATTCGAT	ATCACTAGTG	AATTCGCGGC	CGCCTGCAGG	TCGACCATAT
101	GGGAGAGCTC	CCAACGCGTT	GGATGCATAG	CTTGAGTATT	CTATAGTGTC
151	ACCTAAATAG	CTTGCGGTAA	TCATGGTCAT	AGCTGTTTCC	TGTGTGAAAT
201	TGTTATCCGC	TCACAATTCC	ACACAACATA	CGAGCCGGAA	GCATAAAGTG
251	TAAAGCCTGG	GGTGCCTAAT	GAGTGAGCTA	ACTCACATTA	ATTGCGTTGC
301	GCTCACTGCC	CGCTTTCCAG	TCGGGAAACC	TGTCGTGCCA	GCTGCATTAA
351	TGAATCGGCC	AACGCGCGGG	GAGAGGCGGT	TTGCGTATTG	GGCGCTCTTC
401	CGCTTCCTCG	CTCACTGACT	CGCTGCGCTC	GGTCGTTCGG	CTGCGGCGAG
451	CGGTATCAGC	TCACTCAAAG	CCGGTAATAC	GGTTATCCAC	AGAATCAGGG
501	GATAACGCAG	GAAAGAACAT	GTGAGCAAAA	GGCCAGCAAA	AGGCCAGGAA
551	CCGTAAAAAG	GCCGCGTTGC	TGGCGTTTTT	CCATAGGCTC	CGCCCCCCTG
601	ACGAGCATCA	CAAAAATCGA	CGCTCAAGTC	AGAGGTGGCG	AAACCCGACA

Dessin 1/3

AMENDED SHEET

651	GGACTATAAA	GATACCAGGC	GTTTCCCCCT	GGAAGCTCCC	TCGTGCGCTC
701	TCCTGTTCCG	ACCCTGCCGC	TTACCGGATA	CCTGTCCGCC	TTTCTCCCTT
751	CGGGAAGCGT	GCGCCTTTCT	CATAGCTCAC	GCTGTAGGTA	TCTCAGTTCCG
801	GTGTAGGTCG	TTCGCTCCAA	GCTGGGCTGT	GTGCACGAAC	CCCCCGTTCA
851	GCCCGACCGC	TGCGCCTTAT	CCGGTAACTA	TCGTCTTGAG	TCCAACCCGG
901	TAAGACACGA	CTTATCGCCA	CTGGCAGCAG	CCACTGGTAA	CAGGATTACC
951	AGAGCGAGGT	ATGTAGGCCG	TGCTACAGAG	TTCTTGAAGT	GGTGGCCTAA
1001	CTACGGCTAC	ACTAGAAGGA	CAGTATTTGG	TATCTGCCGT	CTGCTGAAGC
1051	CAGTTACCTT	CGGAAAAGA	GTTGGTAGCT	CTTGATCCGG	CAACAAACC
1101	ACCGCTGGTA	GCGGTGTTTT	TTTTGTTTTG	AAGCAGCAGA	TTACGCGCAG
1151	AAAAAAAGGA	TCTCAAGAAG	ATCCTTTGAT	CTTTTCTACG	GGGTCTGACG
1201	CTCAGTGGAA	CGAAACTCA	CGTTAAGGGA	TTTTGGTCAT	GAGATTATCA
1251	AAAAGGATCT	TCACCTAGAT	CCTTTTAAAT	TAAAAATGAA	GTTTTAAATC
1301	AATCTAAAGT	ATATATGAGT	AAACTTGGTC	TGACAGTTAC	CAATGCTTAA
1351	TCAGTGAGGC	ACCTATCTCA	GCGATCTGTC	TATTTTCGTC	ATCCATAGTT
1401	GCCTGACTCC	CCGTCTGTGA	GATAACTACG	ATACGGGAGG	GCTTACCATC
1451	TGGCCCCAGT	GCTGCAATGA	TACCGCGAGA	CCCACGCTCA	CCGGCTCCAG
1501	ATTTATCAGC	AATAAACCAG	CCAGCCGGAA	GGGCCGAGCG	CAGAAGTGGT
1551	CCTGCAACTT	TATCCGCCTC	CATCCAGTCT	ATTAATTGTT	GCCGGGAAGC
1601	TAGAGTAAGT	AGTTCGCCAG	TTAATAGTTT	GCGCAACGTT	GTTGGCATTG
1651	CTACAGGCAT	CGTGGTGTCA	CGCTCGTCGT	TTGGTATGGC	TTCATTCAGC
1701	TCCGGTTCCC	AACGATCAAG	GCGAGTTACA	TGATCCCCCA	TGTTGTGCAA
1751	AAAAGCGGTT	AGCTCCTTCG	GTCCTCCGAT	CGTTGTCAGA	AGTAAGTTGG

Dessin 2/3

AMENDED SHEET

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07H 21/00, C12N 15/11, C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/10361
			(43) Date de publication internationale: 4 mars 1999 (04.03.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01767		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 7 août 1998 (07.08.98)			
(30) Données relatives à la priorité: 97/10643 26 août 1997 (26.08.97) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.) [FR/FR]; 51/53, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et		Publiée	
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MARTINEZ, Jean [FR/FR]; Chemin des Romains, F-34570 Saussan (FR). GOZE, Catherine [FR/FR]; Résidence Château d'Alco, Bâtiment 8, 33, rue des Avants-Monts, F-34080 Montpellier (FR).		Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.	
(74) Mandataire: BOURGOUIN, André; Beaufour IPSEN - S.C.A.F., Direction de la Propriété Industrielle, 42, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).			
(54) Title: OLIGONUCLEOTIDES FOR IDENTIFYING PRECURSORS OF AMIDATED POLYPEPTIDE HORMONES			
(54) Titre: OLIGONUCLEOTIDES PERMETTANT L'IDENTIFICATION DE PRECURSEURS D'HORMONES POLYPEPTIDIQUES AMIDÉES			
(57) Abstract			
The invention concerns novel oligonucleotides and their application as probes for identifying RNAm's coding for precursors of amidated polypeptide hormones and, thereby, identifying novel amidated polypeptide hormones. The invention also concerns oligonucleotides of the disclosed nucleotide sequence and a method for identifying precursors of amidated hormones.			
(57) Abrégé			
L'invention a pour objet de nouveaux oligonucléotides et leur application comme sondes pour l'identification des ARNm codant pour les précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées et, ainsi, l'identification de nouvelles hormones polypeptidiques amidées. L'invention concerne également des oligonucléotides de séquence nucléotidique décrite et une méthode d'identification des précurseurs d'hormones amidées.			

Publ. Rec'd 18 FEB 1999

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Oligonucléotides permettant l'identification de précurseurs d'hormones
polypeptidiques amidées

La présente invention a pour objet de nouveaux oligonucléotides et leur application comme sondes pour l'identification des ARNm codant pour les précurseurs d'hormones polypeptidiques amidées et, ainsi, l'identification de nouvelles hormones polypeptidiques amidées. L'invention concerne donc des oligonucléotides dont la séquence nucléotidique est décrite ci-après et une méthode d'identification des précurseurs d'hormones amidées.

Les hormones polypeptidiques amidées sont synthétisées sous forme d'un précurseur qui subit une maturation. Cette maturation consiste en une réaction d'amidation.

La réaction d'amidation de l'extrémité C-terminale est une réaction caractéristique des hormones polypeptidiques amidées. Cette réaction, qui intervient sur le précurseur d'une ou plusieurs hormones, permet la maturation de l'hormone et assure également sa biostabilité dans le milieu physiologique : le groupement amide formé est moins vulnérable que la fonction acide libre. L'hormone est alors plus résistante aux carboxypeptidases, elle reste active plus longtemps dans la cellule et garde une affinité optimale avec son site récepteur.

L'amidation a été largement décrite (" Peptide amidation ", Alan F. Bradbury et Derek G. Smyth, TIBS 16 : 112-115, March 1991 et " Functional and structural characterization of peptidylamidoglycolate lyase, the enzym catalyzing the second step in peptide amidation ", A.G. Katopodis, D.S. Ping, C.E. Smith and S.W. May, Biochemistry, 30(25) : 6189-6194, June 1991), son mécanisme est le suivant :

1- clivage de la chaîne polypeptidique précurseur de l'hormone par une endoprotéase au niveau de deux acides aminés basiques qui sont l'arginine et/ou la lysine,

2 - ensuite, se produisent deux clivages par la carboxypeptidase qui conduisent à l'intermédiaire glycine étendu,

3 - l'enzyme PAM (Peptidyl-glycine- α -Amidating Monooxygenase) comprend deux activités enzymatiques distinctes : dans un premier temps, elle convertit l'intermédiaire glycine étendu en dérivé α -hydroxyglycine, la sous unité de l'enzyme PAM qui intervient est la PHM (Peptidyl-glycine- α -Hydrolylating Monooxygenase). Le dérivé obtenu sert de substrat à la deuxième sous unité de la PAM (notée PAL : Peptidyl- α -hydroxyglycine α -Amidating Lyase) qui fixe la fonction amine de la glycine sur l'acide aminé immédiatement adjacent du côté N-terminal et libère le glyoxylate.

Cette réaction impose la présence d'un site de reconnaissance sur le précurseur de ou des hormones, site qui comporte toujours la séquence : glycine et deux acides aminés basiques (arginine ou lysine).

5 Les hormones polypeptidiques amidées qui sont destinées à être sécrétées hors du réticulum endoplasmique sont connues pour comporter une séquence consensus signal d'une quinzaine à une trentaine d'acides aminés, cette séquence est présente à l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique. Elle est coupée plus tard par une enzyme signal peptidase, de sorte qu'on ne la retrouve plus dans la protéine une fois sécrétée.

10 A l'heure actuelle, la découverte d'une nouvelle protéine n'est pas une chose aisée. L'isolement et la purification des protéines peuvent se faire par des techniques diverses : précipitation au point isoélectrique, extraction sélective par certains solvants, puis purification par cristallisation, distribution à contre courant, chromatographie d'adsorption, de partage ou par échange d'ions, électrophorèse... Cependant ces techniques sous-entendent la connaissance des propriétés de la protéine à isoler. Par
15 ailleurs, lorsqu'on dispose d'un échantillon pur d'une nouvelle protéine intéressante sur le plan thérapeutique, il reste encore de nombreuses étapes avant de disposer d'un micro-organisme génétiquement modifié capable de la synthétiser.

20 La méthode proposée par la présente invention offre l'avantage, par l'utilisation d'une particularité de la séquence peptidique du précurseur de toutes hormones amidées connues à ce jour, de permettre la mise en évidence simultanée de plusieurs nouvelles hormones de cette catégorie. Cette recherche se fait par l'identification directe de la séquence nucléotidique codant pour lesdits précurseurs dans des banques d'ADNc préparées à partir de tissus dans lesquels les précurseurs de ces hormones sont susceptibles d'être synthétisés.

25 La recherche par cette méthode est beaucoup moins contraignante que les techniques classiques de biochimie citées précédemment car :

- elle peut conduire à isoler, suivant le même principe, plusieurs précurseurs distincts présents dans le même tissu ;
- elle permet de mettre en évidence, dans les mêmes conditions techniques, des
30 précurseurs correspondant à des hormones ayant des propriétés biochimiques et biologiques très différentes ;
- elle autorise l'identification concomitante de toutes les hormones peptidiques pouvant être contenues dans le même précurseur.

De ce fait, cette invention permet un gain de temps et d'argent non négligeable dans un secteur où les dépenses de Recherche et Développement représentent une proportion très importante du chiffre d'affaires.

La présente invention permettra également l'étude pharmacologique de substances actives ayant un rôle physiologique fondamental dans l'organisme des mammifères : les hormones et plus particulièrement les neurohormones polypeptidiques amidées. Disposant en premier lieu des ADNc correspondant aux substances actives, il sera alors possible d'introduire par génie génétique le vecteur cloné pour mener la synthèse des hormones ayant une application thérapeutique par des micro-organismes.

10 L'invention a d'abord pour objet un oligonucléotide OX simple brin pouvant s'hybrider dans des conditions douces avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinuccléotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinuccléotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence
15 nucléotidique de 1 à 21 nucléotides ou Y5 est supprimé.

On entend par nucléotide une unité monomère de l'ARN ou de l'ADN ayant la structure chimique d'un ester phosphorique de nucléoside. Un nucléoside résulte de la liaison d'une base purique (purine, adénine, guanine ou analogues) ou d'une base pyrimidique (pyrimidine, cytosine, uracile ou analogues) avec le ribose ou le désoxyribose. Un
20 oligonucléotide est un polymère de nucléotides désignant une séquence amorce, une sonde ou un fragment d'ARN ou d'ADN.

Les oligonucléotides cités peuvent être obtenus par synthèse, il existe une méthode automatisée de référence qui est décrite dans les publications suivantes : "DNA synthesis" de S.A. Narang, Tetrahedron, 39, 3 (1983) et "Synthesis and use of synthetic
25 oligonucleotides" de K. Itakura, J.J. Rossi et R.B. Wallace, Annu. Rev. Biochem., 53, 323 (1984).

De préférence, OX peut s'hybrider dans des conditions stringentes avec OY.

De façon plus préférentielle, OX peut s'hybrider avec un oligonucléotide OY de séquence Y2-Y3-Y4-Y5.

30 De façon encore plus préférentiellement, OX peut s'hybrider avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4 ou Y2-Y3-Y4.

Particulièrement, OX peut s'hybrider avec un oligonucléotide OY tel que Y5 représente une séquence nucléotidique Y6-Y7-Y8-Y9 dans laquelle Y6 représente un trinuccléotide

codant pour Ser, Thr, ou Tyr, Y7 représente un trinucéotide codant pour un acide aminé quelconque, Y8 représente un trinucéotide codant pour Glu ou Asp et Y9 représente une séquence nucléotidique comprenant de 1 à 12 nucléotides. Plus particulièrement, OX peut s'hybrider avec un oligonucléotide OY tel que Y1 et Y9 sont supprimés.

- 5 Tout particulièrement, OX peut s'hybrider avec un oligonucléotide OY dans lequel Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly, Y3 représente un trinucéotide codant pour Lys, Y4 un trinucéotide codant pour Arg et Y5 une séquence de 3 trinucéotides codant pour Ser-Ala-Glu.

10 Cette séquence a été déterminée grâce à une étude statistique sur 27 sites d'amidation connus et a conduit à définir sur 6 positions un motif donné d'acides aminés : Gly-Lys-Arg-Ser-Ala-Glu.

15 En raison de la dégénérescence du code génétique et du nombre élevé de codons correspondant à la Gly (4 codons), à l'Arg (6 codons) et à la Ser (6 codons), la séquence de l'oligonucléotide a été construite à l'aide de deux procédés permettant de prendre en compte cette dégénérescence :

- utilisation à certaines positions de l'inosine, nucléotide dont la base azotée, l'hypoxanthine, s'apparie indifféremment avec les 4 bases azotées constitutives de l'ADN,

20 - variation, à certaines positions, de la nature de la base azotée incorporée générant ainsi un nombre de combinaison d'oligonucléotides proportionnel au nombre de bases différentes introduites.

25 La présente invention a également pour objet un oligonucléotide OY comportant de 9 à 42 nucléotides de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinucéotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinucéotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence nucléotidique de 1 à 21 nucléotides ou Y5 est supprimé.

De préférence, l'invention a pour objet un oligonucléotide OY tel que Y1 est supprimé ou tel que Y5 est supprimé.

30 L'invention a particulièrement pour objet un oligonucléotide OY tel que Y5 représente une séquence nucléotidique Y6-Y7-Y8-Y9, dans laquelle Y6 représente un trinucéotide codant pour Ser, Thr ou Tyr, Y7 représente un trinucéotide codant pour un acide aminé

quelconque, Y8 représente un trinucléotide codant pour Glu ou Asp et Y9 représente une séquence nucléotidique comprenant 1 à 12 nucléotides.

L'invention a plus particulièrement pour objet un oligonucléotide OY tel que Y1 et Y9 sont supprimés.

- 5 L'invention a tout particulièrement pour objet un oligonucléotide OY, caractérisé en ce que Y1 est supprimé, Y2 représente un trinucléotide codant pour Gly, Y3 représente un trinucléotide codant pour Lys, Y4 un trinucléotide codant pour Arg et Y5 une séquence de trois trinucléotides codant pour Ser-Ala-Glu.

- 10 La présente invention concerne aussi un oligonucléotide simple brin OZ, caractérisé en ce qu'il comprend de 15 à 39 nucléotides et est capable de s'hybrider avec une séquence consensus signal caractéristique des hormones polypeptidiques amidées, ladite séquence ayant pour formule Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7 dans laquelle Z1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z1 est supprimé, Z2 et Z3 représentent deux trinucléotides codant pour Leu, Z4 et Z5 représentent deux trinucléotides codant pour
15 deux acides aminés quelconques, Z6 représente un trinucléotide codant pour Leu, et Z7 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z7 est supprimé.

Dans cette invention, on entendra par hormone, les hormones polypeptidiques amidées du système endocrinien, et plus particulièrement les neurohormones.

- 20 La séquence consensus signal est une séquence portée par les précurseurs des protéines qui sont sécrétées par les cellules après leur maturation.

La présente invention concerne enfin un ensemble d'oligonucléotides OX ou OZ tel qu'il constitue une librairie combinatoire.

- 25 Dans l'invention décrite, on entend par librairie combinatoire un ensemble d'oligonucléotides synthétisés en prenant pour modèle une séquence nucléotidique codant pour une séquence d'acides aminés dont certains peuvent être variables. Du fait de la dégénérescence du code génétique, on obtiendra un ensemble d'oligonucléotides différents.

Un autre objet de l'invention est une méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

30

1 - obtention d'une banque d'ADN;

2 - hybridation d'un ou plusieurs oligonucléotides OX avec ladite banque d'ADN;

3 - identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide OX;

5 4 - identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

On préférera une méthode telle que la banque d'ADN est une banque d'ADNc.

L'ADN complémentaire (ADNc) est une chaîne nucléotidique dont la séquence est complémentaire de celle d'un ARNm, la réaction conduisant aux ADNc monocaténaire est catalysée par la transcriptase inverse. L'ADNc bicaténaire peut être obtenu par action de
10 l'ADN polymérase, il est ensuite inséré à l'aide d'une ligase dans un plasmide ou un vecteur dérivé du bactériophage λ .

Une banque d'ADNc regroupe les ADNc correspondant aux ARNm cytoplasmiques extrait d'une cellule donnée. La banque est dite complète lorsqu'elle comprend au moins
15 un clone bactérien pour chaque ARNm de départ.

L'hybridation a lieu lorsque deux oligonucléotides ont des séquences nucléotidiques substantiellement complémentaires, ils peuvent s'associer sur leur longueur par établissement de liaisons hydrogène entre bases complémentaires.

On préférera particulièrement une méthode telle que l'oligonucléotide OX est détectable à
20 l'aide d'un agent de marquage, tel que le ^{32}P ou la digoxygénine.

Les agents de marquage radioactif des nucléotides les plus couramment utilisés sont les éléments qui émettent des rayons β , par exemple, ^3H , ^{12}C , ^{32}P , ^{33}P et ^{35}S .

Le marquage de l'oligonucléotide se fait par l'addition à son extrémité 5' d'un groupement phosphate apporté par le $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{-ATP}$, cette réaction est catalysée par
25 l'enzyme T4-polynucléotide kinase. Le marquage par la digoxygénine est immunoenzymatique, la digoxygénine est associée à une base azotée et incorporée à l'oligonucléotide. Sa présence est révélée par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la digoxygénine et couplé à une phosphatase alcaline. La révélation utilise la couleur développée par un substrat hydrolysé par la phosphatase alcaline.

30 D'autres techniques de marquage peuvent être employées : oligonucléotides modifiés chimiquement pour qu'ils contiennent un agent de complexation des métaux (on utilise

souvent des complexes du lanthanide), un groupe contenant de la biotine ou ester d'acridine, un composé fluorescent (fluoresceine, rhodamine, Texas red) ou autre.

On préférera tout particulièrement une méthode d'identification de précurseur d'hormone polypeptidique amidée telle que l'étape d'hybridation utilise une librairie combinatoire d'oligonucléotides OX.

L'invention a encore pour objet une méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, qui comprend les étapes suivantes :

1 - obtention d'une banque d'ADN;

2 - utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides OX et un autre ensemble d'oligonucléotides OZ;

3 - identification de la séquence d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec l'oligonucléotide OX et qui a été amplifiée par la réaction de PCR;

4 - identification dans cette séquence d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminale amidée.

On entend par fragment d'intérêt la séquence d'ADNc codant pour le précurseur d'une ou plusieurs hormones polypeptidiques amidées.

La réaction d'amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) nécessite une préparation d'ADN dénaturé par chauffage à 95°C. Ensuite, cette préparation est appariée à un excès de deux oligonucléotides complémentaires aux brins opposés de l'ADN, de part et d'autre de la séquence à amplifier. Chaque oligonucléotide sert ensuite d'amorce à une DNA polymérase (extraite de bactéries thermophiles du type *Thermus aquaticus* : Taq polymérase) pour la copie de chacun des brins de l'ADN. Ce cycle peut être répété, de manière automatisée, par dénaturations-renaturations successives.

Il existe de nombreuses références détaillant les protocoles du PCR : Brevets US n° 4.683.192, 4.683.202, 4.800.159 et 4.965.188, "PCR technology : principles and applications for DNA amplification", H. Erlich, ed. Stockton Press, New York (1989) et "PCR protocols : a guide to methods and applications", Innis et al., eds. Academic Press, San Diego, California (1990).

De préférence, ladite banque d'ADN est une banque d'ADNc.

Plus préférentiellement, ledit oligonucléotide OX est détectable à l'aide d'un agent de marquage tel que le ³²P ou la digoxygénine.

On préférera particulièrement une méthode d'identification de précurseur d'hormone polypeptidique amidée telle que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire d'oligonucléotides OX et une autre librairie combinatoire d'oligonucléotides OZ.

Un autre objet de l'invention est une méthode d'identification du précurseur d'un peptide
5 ayant une extrémité C-terminale amidée, qui comprend les étapes suivantes :

1 - obtention d'une banque d'ADN;

2 - utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides OX;

3 - identification de la séquence d'ADN de ladite banque qui s'hybride
10 avec l'oligonucléotide OX et qui a été amplifiée par la réaction de PCR;

4 - identification dans cette séquence d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminale amidée.

Le but de cette méthode est de caractériser les séquences nucléotidiques codant pour des précurseurs présentant plus d'un site d'amidation.

15 De préférence, ladite banque d'ADN est une banque d'ADNc.

Plus préférentiellement, ledit oligonucléotide OX est détectable à l'aide d'un agent de marquage tel que le ³²P ou la digoxygénine.

On préférera particulièrement une méthode d'identification de précurseur d'hormone polypeptidique amidée telle que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire
20 d'oligonucléotides OX.

Une autre méthode proposée par la présente invention pour l'identification du précurseur d'un polypeptide ayant une extrémité C-terminale amidée, est caractérisée par les étapes suivantes :

1 - obtention d'une banque d'ADN;

25 2 - utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un oligonucléotide OX et un autre oligonucléotide simple brin capable de s'hybrider en conditions douces ou stringentes avec une séquence consensus universelle contenue dans la séquence du vecteur plasmidique dans lequel sont clonés les ADN de la dite banque d'ADN, tels que les primers T3, T7, KS, SK, M13, Reverse;

3 - identification de la séquence d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide OX;

4 - identification dans cette séquence d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminale amidée.

- 5 La séquence consensus universelle est une séquence portée par le vecteur dans lequel est cloné l'ADN de la banque. Cette séquence peut servir d'amorce pour le séquençage. Les séquences nucléotidiques de ces primers sont disponibles dans : Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *"Molecular cloning, a laboratory manual"*, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 10 La réaction du PCR nécessite que deux oligonucléotides se fixent sur l'ADNc cloné dans un vecteur pour que son amplification ait lieu. Dans le cas où l'on ne connaît qu'une seule séquence propre au fragment d'ADN à amplifier, une solution pour contourner ce problème est d'utiliser un oligonucléotide qui pourra s'hybrider avec une séquence nucléotidique propre au vecteur dans lequel a été cloné l'ADNc, telle qu'une séquence
- 15 consensus universelle.

De préférence, ladite banque d'ADN est une banque d'ADNc.

On préférera un oligonucléotide OY détectable à l'aide d'un agent de marquage tel que le ³²P ou la digoxygénine.

- 20 On préférera plus particulièrement une étape d'amplification utilisant une librairie combinatoire d'oligonucléotides OX.

EXEMPLE :

La méthode décrite par l'invention a été validée par son application sur une hormone déjà isolée. La neurohormone choisie est la cholécystokinine (CCK) qui est le neuromédiateur quantitativement le plus important représenté dans le cerveau.

- 5 1.1. Préparation de la matrice d'ADN servant aux réactions de PCR à partir d'une banque commerciale Lambda Zapp II (Rat Brain cDNA Library Vector, réf. 936 501) de STRATAGENE (Lafolla, U.S.A.).

Cette banque d'ADNc Stratagène contient le clonage des ADNc de cellules de cerveau de rat.

- 10 1.1.1. Libération des ADNc clonés sous forme de phagemides Bluescript (Stratagene, Lajolla, U.S.A.).

Elle se fait en suivant le protocole suivant : on met en contact pendant 15 minutes à 37°C, 250 µl de la banque d'ADNc à 2.10⁸ PFU/ml, 200 µl de bactéries XL₁ blue (génotype : recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)]^c - cf. Bullock, Fernandez, Short, *Biotechniques*, 5, 376-379 (1987) - densité
15 optique à 600 nm : D.O. = 2,5) et 1 µl de phage ExAssist™ (cf. Hay, B., Short, J., *Strategies*, 5, 16-18 (1992)) à 10¹⁰ PFU/ml. Puis l'ensemble est incubé sur 50 ml de milieu LB (composition : pour 1 litre d'eau physiologique stérile, on mélange 10 g de NaCl, 5 g d'extrait de levure et 10 g de Bactotryptone) pendant 3 heures sous agitation à
20 37°C. Le bouillon de culture est centrifugé puis le surnageant est inactivé par chauffage à 70°C pendant 20 minutes.

- 1.1.2. Obtention des ADNc sous forme d'une banque de plasmides double brin.

Cette étape nécessite 15 minutes d'incubation à 37°C de 100 µl du surnageant inactivé et 200 µl de bactéries SOLR™ (génotype : e14⁻(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC
25 recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ^R [F' proAB lacI^qZAM15]^c Su⁻ (nonsuppressing) - cf. Hay, B., Short, J.M., *Strategies*, 5(1), 16-18 (1992) - D.O. = 1 à 600 nm). Après addition de 50 µl d'ampicilline (à 100 mg/ml) et de 50 ml de milieu LB, le tout est mis à incuber à 37°C sous agitation pendant une nuit. Les plasmides sont préparés à partir de 50 ml de culture avec le protocole et les colonnes
30 QIAGEN Plasmid Midi Kit de QIAGEN (les colonnes QIAGEN contiennent une résine d'échange anionique possédant à sa surface des groupes diéthylaminoéthanol chargés positivement, lesquels interagissent avec les phosphates du squelette de l'ADN). On a ainsi obtenu une solution d'ADN à 1,37 µg/µl.

1.2. Amplification d'une portion du précurseur de la CCK à partir de la banque de plasmides ainsi préparée.

1.2.1. Etablissement des séquences des deux oligonucléotides nécessaires à la réaction de PCR.

- 5 L'un de ces deux nucléotides contiendra la séquence complémentaire à celle codant pour le site d'amidation de la CCK, ce site est connu et a pour séquence Gly-Arg-Arg-Ser-Ala-Glu. Cet oligonucléotide, que l'on nommera *oligo CCK amid*, a pour séquence nucléotidique :

5' CTCAGCACTGCGCCGGCC 3'

- 10 Le second oligonucléotide, noté *oligo CCK 5'*, correspond à la séquence consensus signal :

5' GTGTGTCTGTGCGTGGTG 3'

- 15 La taille du produit d'amplification attendu est de 315 paires de bases, c'est la distance existant entre les séquences correspondant à ces deux oligonucléotides sur la séquence précurseur de la CCK.

1.2.2. Réaction de PCR.

- 20 On prépare une dilution D₁ contenant 1 µl d'enzyme Taq polymérase Goldstar 5 U/µl (cf. Reynier, P., Pellissier, J.F., Harle, J.R., Malthiéry, Y., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **205**(1), 375-380 (1994)), 1 µl d'un tampon 10 fois concentré en Taq polymérase standard et 8 µl d'eau.

Puis on mélange 1 µl d'*oligo CCK 5'* à 250 ng/µl, 1 µl d'*oligo CCK amid* à 250 ng/µl, 1 µl dNTP à 10 mM chacun, 1 µl d'ADN banque ADNc à 250 ng/µl, 5 µl de tampon 10 fois concentré de l'enzyme Taq polymérase, 2 µl MgCl₂ à 25 mM, 1 µl de la dilution D₁ et 37 µl d'eau.

- 25 Les conditions d'amplification sont les suivantes : on effectue d'abord un traitement thermique de 5 minutes à 95°C, puis on renouvelle 30 cycles. Les dénaturations se font pendant 45 secondes à 95°C, l'hybridation pendant 30 secondes à 60°C et l'élongation pendant 1 minute à 72°C. Enfin, un cycle supplémentaire est mené avec une élongation de 10 minutes à 72°C.

1.2.3. Résultats.

Les résultats sont lus par migration sur gel d'agarose à 0,8% de 1/10 du produit de la réaction de PCR. En présence de bromure de 3,8-diamino-5-éthyl-6-phénylphénanthridinium (bromure d'éthydiu), on visualise sur le gel une bande unique, intense, de taille légèrement supérieure au marqueur de poids moléculaire 300.

1.3. Sous clonage du produit PCR dans un vecteur permettant le séquençage.

Le vecteur utilisé est le pGEM T-easy Vector (commercialisé par PROGEMA Corporation, Madison, U.S.A., réf. A'1380 - séquence donnée en annexe I). Les étapes sont les suivantes :

- purification de la bande correspondante au produit PCR par électroélution,
- ligation durant une nuit à 16°C avec 1 µl de vecteur pGEM T-easy à 50 ng/µl, 1 µl de tampon ligase concentré 10 fois,
- 3 µl de produit extrait de la bande purifié estimée à 20 ng/µl,
- on complète avec de l'eau jusqu'à 10 µl.

Les bactéries JM 109 (génotype : e14⁻(McrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK⁻mK⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15] - cf. Yanish-Perron, C., Viera, J., Messing, J., *Gene*, 33, 103-199 (1985)) sont rendues compétentes par un traitement préalable au CaCl₂ puis transformées par un choc thermique de 45 secondes à 42°C avec 1/5 de la ligation. Les cellules sont ensuite mises en culture sur le milieu LB-ampicilline en boîte de Pétri pendant toute une nuit à 37°C.

On prépare l'ADN plasmidique de quelques clones recombinant. Puis le sous clonage est vérifié par la digestion enzymatique avec Eco RI.

1.4. Séquençage.

Il est effectué par la technique classique des didésoxynucléotides de SANGER sur le vecteur pGEM T-easy Vector ayant incorporé le produit PCR de 315 paires de bases (préparé à grande échelle par le kit QIAGEN tip 100). L'amorce utilisée pour le séquençage est l'oligonucléotide universel T7 présent sur le plasmide pGEM T-easy Vector.

1.5. Résultat.

Le séquence brute suivante est obtenue :

GTG TGT CTG TGC GTG GTG ATG GCA GTC CTG GCA GCA GGC GCC CTG
 GCG CAG CCG GTA GTC CCT GTA GAA GCT GTG GAC CCT ATG GAG CAG
 5 CGG GCG GAG GAG GCG CCC CGA AGG CAG CTG AGG GCT GTG CTC CGA
 CCG GAC AGC GAG CCC CGA GCG CGC CTG GGC GCA CTG CTA GCC CGA
 TAC ATC CAG CAG GTC CGC AAA GCT CCC TCT GGC CGC ATG TCC GTT
 CTT AAG AAC CTG CAG GGC CTG GAC CCT AGC CAC AGG ATA AGT GAC
 CGG GAC TAC ATG GGC TGG ATG GAT TTC GGC CGG CGC AGT GCT GAG

10 La traduction en acides aminés de la séquence obtenue aboutit à :

VCLCVV	MAVLAAGALA	QPVVPVEAVD	PMEQRAEEAP
RRQLRAVLRP	DSEPRARLGA	LLARYIQQVR	KAPSGRMSVL
KNLQGLDPSH	RISDRDYMGW	MDFGRRSAE	

permet bien de retrouver la séquence nucléotidique du précurseur de la CCK (dont la séquence a été fournie par la banque de données Swiss Prot n° p01355).

L'abréviation des acides aminés est la suivante :

Alanine	A	Leucine	L
Argine	R	Lysine	K
Acide aspartique	D	Méthionine	M
Asparagine	N	Phénylalanine	F
Cystéine	C	Proline	P
Acide glutamique	E	Sérine	S
Glutamine	Q	Thréonine	T
Glycine	G	Tryptophane	W
Histidine	H	Tyrosine	Y

Isoleucine

I

Valine

V

Revendications

1. Oligonucléotide OX simple brin, caractérisé en ce qu'il comprend de 9 à 42 nucléotides et est capable de s'hybrider dans des conditions douces avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une
5 séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinuccléotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinuccléotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence nucléotidique de 1 à 21 nucléotides ou Y5 est supprimé.
2. Oligonucléotide OX selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend de 9 à
10 42 nucléotides et est capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec un oligonucléotide OY de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinuccléotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinuccléotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence nucléotidique de 1 à 21
15 nucléotides ou Y5 est supprimé.
3. Oligonucléotide OX selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que Y1 est supprimé dans l'oligonucléotide OY.
4. Oligonucléotide OX selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que Y5 est supprimé dans l'oligonucléotide OY.
- 20 5. Oligonucléotide OX selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que, dans OY, Y5 représente une séquence nucléotidique Y6-Y7-Y8-Y9, dans laquelle Y6 représente un trinuccléotide codant pour Ser, Thr, ou Tyr, Y7 représente un trinuccléotide codant pour un acide aminé quelconque, Y8 représente un trinuccléotide codant pour Glu ou Asp et Y9 représente une séquence nucléotidique comprenant de 1 à 12 nucléotides.
- 25 6. Oligonucléotide OX selon la revendication 5, caractérisé en ce que Y1 et Y9 sont supprimés dans l'oligonucléotide OY.
7. Oligonucléotide OX selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il peut s'hybrider avec ledit oligonucléotide OY dans lequel Y2 représente un trinuccléotide codant pour Gly,

Y3 représente un trinuécléotide codant pour Lys, Y4 un trinuécléotide codant pour Arg et Y5 une séquence de 3 trinuécléotides codant pour Ser-Ala-Glu.

8. Oligonuécléotide simple brin OY, caractérisé en ce qu'il comprend de 9 à 42 nucléotides de séquence Y1-Y2-Y3-Y4-Y5, dans laquelle Y1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Y1 est supprimé, Y2 représente un trinuécléotide codant pour Gly, Y3 et Y4 représentent indépendamment un trinuécléotide codant pour Arg ou Lys, et Y5 représente une séquence nucléotidique de 1 à 21 nucléotides ou Y5 est supprimé.

9. Oligonuécléotide OY selon la revendication 8, caractérisé en ce que Y1 est supprimé

10. Oligonuécléotide OY selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que Y5 est supprimé.

11. Oligonuécléotide OY selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que Y5 représente une séquence nucléotidique Y6-Y7-Y8-Y9, dans laquelle Y6 représente un trinuécléotide codant pour Ser, Thr, ou Tyr, Y7 représente un trinuécléotide codant pour un acide aminé quelconque, Y8 représente un trinuécléotide codant pour Glu ou Asp et Y9 représente une séquence nucléotidique comprenant de 1 à 12 nucléotides.

12. Oligonuécléotide OY selon la revendication 11, caractérisé en ce que Y1 et Y9 sont supprimés.

13. Oligonuécléotide OY selon la revendication 12, caractérisé en ce que Y2 représente un trinuécléotide codant pour Gly, Y3 représente un trinuécléotide codant pour Lys, Y4 un trinuécléotide codant pour Arg et Y5 une séquence de 3 trinuécléotides codant pour Ser-Ala-Glu.

14. Oligonuécléotide simple brin OZ, caractérisé en ce qu'il comprend de 15 à 39 nucléotides et est capable de s'hybrider en conditions douces ou stringentes avec une séquence consensus signal caractéristique des hormones polypeptidiques amidées, ladite séquence a pour formule Z1-Z2-Z3-Z4-Z5-Z6-Z7 dans laquelle Z1 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z1 est supprimé, Z2 et Z3 représentent deux trinuécléotides codant pour Leu, Z4 et Z5 représentent deux trinuécléotides codant pour deux acides aminés quelconques, Z6 représente un trinuécléotide codant pour Leu, et Z7 représente une séquence nucléotidique de 1 à 12 nucléotides ou Z7 est supprimé.

15. Ensemble d'oligonuécléotides OX selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 ou d'oligonuécléotides OZ selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il constitue une librairie combinatoire.

16. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- hybridation d'un ou plusieurs oligonucléotides selon l'une
5 quelconque des revendications 1 à 7 avec ladite banque d'ADN;
- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;
- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

10 **17. Méthode selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'étape d'hybridation utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.**

18. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;
- 15 - utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et d'un autre ensemble d'oligonucléotides selon la revendication 14;
- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;
- 20 - identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

19. Méthode selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15.

25 **20. Méthode d'identification du précurseur d'un peptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes successives suivantes :**

- obtention d'une banque d'ADN;
- utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un ensemble d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;

- identification de la ou les séquences d'ADN de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7;

- identification dans cette ou ces séquences d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminal amidée.

5 **21. Méthode selon la revendication 20, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15 .**

22. Méthode d'identification du précurseur d'un polypeptide ayant une extrémité C-terminale amidée, caractérisée par les étapes suivantes :

- obtention d'une banque d'ADN;

10 - utilisation de la technique PCR pour amplifier le fragment d'intérêt à l'aide d'un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendication 1 à 7 et un autre oligonucléotide simple brin capable de s'hybrider en conditions douces ou stringentes avec une séquence consensus universelle contenue dans la séquence du vecteur plasmidique dans lequel sont clonés les ADNc de la dite banque d'ADN, tels que les
15 primers T3, T7, KS, SK, M13, Reverse;

- identification de la séquence d'ADNc de ladite banque qui s'hybride avec un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendication 1 à 7;

- identification dans cette séquence d'un ou plusieurs peptides avec une possible extrémité C-terminale amidée.

20 **23. Méthode selon la revendication 22, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une librairie combinatoire selon la revendication 15 .**

24. Méthode selon l'une quelconque des revendications 16 à 23, caractérisée en ce que la banque d'ADN est une banque d'ADNc.

25 **25. Méthode selon l'une quelconque des revendications 16 à 24, caractérisée en ce que l'oligonucléotide simple brin est détectable à l'aide d'un agent de marquage, tel que le ³²P ou la digoxygénine.**

ANNEXE I

Séquence du plasmide pGEM®-T Easy Vector

Le plasmide pGEM®-T Easy Vector, dont la séquence est reproduite ci-dessous, a été linéarisé avec *EcoR* V à la base 60 de cette séquence (indiquée par une astérisque). On lui a ajouté un T aux deux extrémités 3'. Le T ajouté n'est pas inclus dans cette séquence. La séquence reproduite ci-après correspond à l'ARN synthétisé par la T7 ARN polymérase et est le complémentaire de l'ARN synthétisé par la SP6 ARN polymérase.

1	GGGCGAATTG	GGCCCGACGT	CGCATGCTCC	CGGCCGCCAT	GGCGGCCGCG
51	GGAATTCGAT*	ATCACTAGTG	AATTCGCGGC	CGCCTGCAGG	TCGACCATAT
101	GGGAGAGCTC	CCAACGCGTT	GGATGCATAG	CTTGAGTATT	CTATAGTGTC
151	ACCTAAATAG	CTTGCGGTAA	TCATGGTCAT	AGCTGTTTCC	TGTGTGAAAT
201	TGTTATCCGC	TCACAATTCC	ACACAACATA	CGAGCCGGAA	GCATAAAGTG
251	TAAAGCCTGG	GGTGCCTAAT	GAGTGAGCTA	ACTCACATTA	ATTGCGTTGC
301	GCTCACTGCC	CGCTTTCAG	TCGGGAAACC	TGTCGTGCCA	GCTGCATTAA
351	TGAATCGGCC	AACGCGCGGG	GAGAGGCGGT	TTGCGTATTG	GGCGCTCTTC
401	CGCTTCCTCG	CTCACTGACT	CGCTGCGCTC	GGTCGTTCGG	CTGCGGCGAG
451	CGGTATCAGC	TCACTCAAAG	GCGGTAATAC	GGTTATCCAC	AGAATCAGGG
501	GATAACGCAG	GAAAGAACAT	GTGAGCAAAA	GGCCAGCAAA	AGGCCAGGAA
551	CCGTAAAAAG	GCCGCGTTGC	TGGCGTTTTT	CCATAGGCTC	CGCCCCCCTG
601	ACGAGCATCA	CAAAAATCGA	CGCTCAAGTC	AGAGGTGGCG	AAACCCGACA

1801	CCGCAGTGTT	ATCACTCATG	GTTATGGCAG	CACTGCATAA	TTCTCTTACT
1851	GTCATGCCAT	CCGTAAGATG	CTTTTCTGTG	ACTGGTGAGT	ACTCAACCAA
1901	GTCATTCTGA	GAATAGTGTA	TGCGGCGACC	GAGTTGCTCT	TGCCCCGGCGT
1951	CAATACGGGA	TAATACCGCG	CCACATAGCA	GAACTTTAAA	AGTGCTCATC
2001	ATTGGAAAAC	GTTCTTCGGG	GCGAAAACCTC	TCAAGGATCT	TACCGCTGTT
2051	GAGATCCAGT	TCGATGTAAC	CCACTCGTGC	ACCCAACCTGA	TCTTCAGCAT
2101	CTTTTACTTT	CACCAGCGTT	TCTGGGTGAG	CAAAAACAGG	AAGGCAAAAT
2151	GCCGCAAAAA	AGGGAATAAG	GGCGACACGG	AAATGTTGAA	TACTCATACT
2201	CTTCCTTTTT	CAATATTATT	GAAGCATTTA	TCAGGGTTAT	TGTCTCATGA
2251	GCGGATACAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	ATAAACAAAT	AGGGGTTCCG
2301	CGCACATTTT	CCCGAAAAGT	GCCACCTGTA	TGCGGTGTGA	AATACCGCAC
2351	AGATGCGTAA	GGAGAAAATA	CCGCATCAGG	CGAAATTGTA	AACGTTAATA
2401	TTTTGTTAAA	ATTCGCGTTA	AATATTTGTT	AAATCAGCTC	ATTTTTTAAC
2451	CAATAGGCCG	AAATCGGCAA	AATCCCTTAT	AAATCAAAAG	AATAGACCGA
2501	GATAGGGTTG	AGTGTTGTTC	CAGTTTGGA	CAAGAGTCCA	CTATTAAAGA
2551	ACGTGGACTC	CAACGTCAAA	GGGCGAAAAA	CCGTCTATCA	GGGCGATGGC
2601	CCACTACGTG	AACCATCACC	CAAATCAAGT	TTTTTGCGGT	CGAGGTGCCG
2651	TAAAGCTCTA	AATCGGAACC	CTAAAGGGAG	CCCCCGATTT	AGAGCTTGAC
2701	GGGGAAAGCC	GGCGAACGTG	GCGAGAAAGG	AAGGGAAGAA	AGCGAAAGGA
2751	GCGGGCGCTA	GGGCGCTGGC	AAGTG TAGCG	GTCACGCTGC	GCGTAACCAC
2801	CACACCCGCC	GCGCTTAATG	CGCCGCTACA	GGGCGCGTCC	ATTCGCCATT
2851	CAGGCTGCGC	AACTGTTGGG	AAGGGCGATC	GGTGCGGGCC	TCTTCGCTAT
2901	TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA
2951	ACGCCAGGGT	TTTCCCAGTC	ACGACGTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGAATT
3001	GTAATACGAC	TCACTATA			

651 GGACTATAAA GATACCAGGC GTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC
701 TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT
751 CGGGAAGCGT GCGCCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG
801 GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTC
851 GCCCGACCGC TCGCCTTAT CCGGTAATA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG
901 TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
951 AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA
1001 CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC
1051 CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
1101 ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTGTTGC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG
1151 AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG
1201 CTCAGTGGA CGAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA
1251 AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC
1301 AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA
1351 TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTTCGTT ATCCATAGTT
1401 GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC
1451 TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG
1501 ATTTATCAGC AATAAACCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT
1551 CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC
1601 TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGGCATTG
1651 CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTACGC
1701 TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA
1751 AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/EP 98/01767

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07H21/00 C12N15/11 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>A.G.KATOPODIS ET AL.: "Functional and Structural Characterization of Peptidylamidoglycolate Lyase, the Enzyme Catalyzing the Second Step in Peptide Amidation."</p> <p>BIOCHEMISTRY., vol. 30, no. 25, 25 June 1991, pages 6189-6194, XP002074069 EASTON, PA US cited in the application see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 1999

Date of mailing of the international search report

29/01/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 98/01767

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>S.A.NARANG: "dna synthesis" TETRAHEDRON., vol. 39, no. 1, 1983, pages 3-22, XP002074070 OXFORD GB cited in the application see the whole document -----</p>	1